

Die Reinigung des Prothrombins

von

JOCHEN LANGE

1962

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. E. Heinz)

DIE REINIGUNG DES PROTHROMBINS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zur Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jochen Lange
aus Oldenburg i.O.
Frankfurt am Main, im Mai 1962



Dekan: Prof. Dr. K. Herzberg

Referent: Prof. Dr. L. Roka

Correferent: Prof. Dr. A. Wacker

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juni 1962

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	3
Experimenteller Teil	
I. Versuchsanordnung	6
II. Faktoren, Reagenzien und Adsorptionsmittel	7
III. Meßmethoden	8
Versuchsergebnisse	
Vorversuch	11
Reinigungsversuche	11
Diskussion	32
Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis	36

EINLEITUNG

Die heute wahrscheinlichsten Ansichten über die I. Phase des sehr komplizierten Gerinnungsablaufes, der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch das Extrinsic-System, können in folgendem Schema, modifiziert nach D e u t s c h (1.), zusammengefaßt werden. (Fig.1)

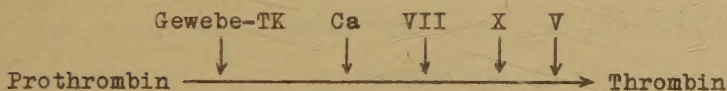


Fig.1 Die I. Phase des Gerinnungsablaufes

Dabei liefern Gewebethrombokinas (TK), Calcium (Ca), Faktor VII (Proconvertin), Faktor X und Faktor V (Accelerin) zusammen die Prothrombinase.

Über die Prothrombinase (O w r e n), von K o l l e r auch als Prothrombinaktivator bezeichnet, ist bekannt, daß bei der Entstehung dieses Wirkstoffes mehrere Komponenten zusammenwirken müssen. Unbekannt ist aber, ob alle Komponenten, die an der Prothrombinumwandlung beteiligt sind, bereits voneinander getrennt worden sind.(2.) So haben Untersuchungen von O w r e n , S e e g e r s , Q u i c k , K o l l e r , d e V r i e s , A l e x a n d e r und G o l d s t e i n ergeben, daß das Prothrombin selbst aus einem Komplex von mindestens drei Komponenten, nämlich Prothrombin, Faktor V

und Faktor VII, besteht. (zit.n.3.). Diese Komponenten, alles Globuline, haben viele gemeinsame physikalische und chemische Eigenschaften. Die Untersuchungen von L a s c h und R o k a (3.u.4.) zeigen, daß auch genetische Beziehungen zwischen Prothrombin und Faktor VII bestehen. So ist es wahrscheinlich zu erklären, daß Faktor V und Faktor VII bei der Darstellung des Prothrombins sehr schwer abzutrennen sind. Ein völlig reines Prothrombinpräparat ist aber zur genauen Analyse und Molekulargewichtsbestimmung des Prothrombins ebenso erforderlich wie für die Untersuchungen über die Prothrombinumwandlung.

Obwohl eine ausreichend systematische Untersuchung der Isolierungsbedingungen fehlt, wurde die Darstellung gereinigter Prothrombinpräparate von vielen Autoren beschrieben (5.). Dabei hat sich die Adsorptionsmethode fast ausschließlich durchgesetzt.

O w r e n hat ein Faktor V-freies Präparat durch Adsorption an Magnesiumhydroxydaufschwemmung und Eluierung mit CO_2 angegeben. Ein ähnliches, gereinigtes und angeblich auch Faktor VII-freies Prothrombin erhält S e e g e r s indem er ebenfalls an Magnesiumhydroxyd adsorbiert und mit CO_2 eluiert.

F l y n n und C o o n benützen Seitzfilter, adsorbieren mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ und eluieren mit Phosphatpuffer nach Mc Ilvaine.

S t r ä s s l e adsorbiert das Prothrombin an BaSO_4 und

eluiert ebenfalls mit Phosphatpuffer.

S u r g e n o r adsorbiert an BaSO_4 und eluiert mit Natriumcitrat, gibt aber an, daß dieses Prothrombin noch Faktor VII enthält.

R o k a s Versuche (8.) ergaben ebenfalls, daß mit verschiedenen Adsorptionsmitteln Prothrombinpräparate gewonnen werden, deren Gehalt an anderen Faktoren (damals noch als "labile Komponente" bezeichnet) verschieden groß ist. Dabei war auch in den durch BaSO_4 gewonnenen Prothrombinpräparaten am wenigsten von dieser "labilen Komponente" enthalten.

Das später von R o k a hergestellte Prothrombin (6.), modifiziert nach dem in der Havard-Vorschrift Nr. 12 zur Plasmafraktionierung beschriebene Verfahren, wird ebenfalls an BaSO_4 adsorbiert und mit Natriumcitrat eluiert. Dieses Prothrombin enthält aber immer noch Faktor V und Faktor VII.

Meine Aufgabe bestand darin zu prüfen, wieweit durch Adsorption an verschiedene Adsorbentien dieses Prothrombinpräparat weiter gereinigt werden kann. Insbesondere sollte versucht werden, die Faktor V-, die Faktor VII- und die Thrombokinas-Aktivität vom Prothrombin abzutrennen.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Versuchsanordnung

Durch Kombination verschiedener Komponenten aus Gewebe-, Blutzellen-, Plasma- und Serum wird die Wirkung des Prothrombinaktivators nachgeahmt.

Die Kombination Gewebethrombokinase + Calciumionen + Faktor VII + Faktor V wurde als Aktivatorimitation bei allen Versuchen verwendet.

Mit dieser Kombination entsteht aus den Prothrombinpräparaten autokatalytisch Thrombin (2.), das durch Zusatz von Fibrinogen Fibrin bildet. Als Gerinnungszeit wird die Zeit gemessen, die vom Zusatz der Probe (Prothrombin + Aktivator) zur Fibrinogenlösung bis zur Gerinnung verstreicht. Aus der Gerinnungszeit wird die Aktivität des Prothrombins bestimmt. Um die Anwesenheit von Faktor V, Faktor VII (X) und Thrombokinase im Prothrombin feststellen zu können, werden die Proben vor und nach der Behandlung mit Adsorptionsmitteln in folgenden Ansätzen gemessen:

<u>A.</u>	Prothrombin (PTB)	<u>B.</u>	PTB
	Thrombokinase (TK)		TK
	Faktor V (V)		V
	Sammelserum (SS) (enthält die Faktoren VII und X)		NaCl
	CaCl ₂		CaCl ₂

<u>C.</u>	PTB	<u>D.</u>	PTB
	TK		NaCl
	NaCl		V
	SS		SS
	CaCl ₂		CaCl ₂

Ein Faktor ist in den Ansätzen B, C und D jeweils durch gepufferte 0,9%ige NaCl-Lösung ersetzt.

Eine Änderung der Gerinnungszeit (und damit der Prothrombinaktivität) in diesen Ansätzen, gemessen vor und nach der Behandlung des Prothrombinpräparates mit Adsorptionsmitteln, gibt den Hinweis auf einen möglichen Reinigungserfolg.

II. Faktoren, Reagenzien und Adsorptionsmittel

a) Faktoren und Reagenzien

Prothrombin (PTB): hergestellt nach (6.), Lösung mit
Aqua bidest., pH = 7,0, gemessen in
verschiedenen Konzentrationen

Thrombokinase (TK): Acetontrockenpulver von Humanhirn,
200 mg%ig in gepufferter 0,9%iger
NaCl-Lösung nach Säurebehandlung

Faktor V (V): hergestellt nach (7.), 50 mg%ig in gepufferter 0,9%iger NaCl-Lösung

Sammelserum (SS): Humanmischserum (für die Faktoren VII und X)

Fibrinogen (F'gen): Rinder-Fibrinogen (Behring),
300 mg%ig in gepufferter 0,9%iger
NaCl-Lösung

CaCl_2 -Lösung: m/40

Physiol. NaCl-Lösung: mit Veronalpuffer auf pH = 7,6
eingestellt

Natriumcitrat: 5%ig

b) Adsorptionsmittel

1. DEAE-Zellulose: in Phosphatpuffer 0,005 m pH = 7,0

2. Aktivkohle (Eponit 113n): mit HCl gewaschen

3. BaSO_4

4. BaCO_3

5. Dowex - X 1 : (Dow Chemical Comp. Midland,
Michigan, USA)

6. Super Cel: mit Phosphatpuffer 0,3m pH = 6,6
gewaschen

7. Bentonit: mit Bidest. gewaschen (Riedel-de HAEN AG
Seelze-Hannover)

8. Bolus alba (Kaolin)

9. SiO_2 : K 3g (Aerosil, Degussa)

III. Meßmethoden

a) Bestimmung des Prothrombins und der Gerinnungszeit
Vorversuch:

Vom Prothrombin wird eine Verdünnungsreihe (50,40,30,
20,10 mg%) hergestellt. Zu 0,2 ml dieser Lösungen wird
jeweils die Aktivatorimitation in folgenden Mengen bei-
gegeben:

0,2 ml Thrombokinas

0,2 ml Faktor V

0,2 ml Sammelserum (enthält VII und X)

0,2 ml CaCl_2 -Lösung

Dieses Gemisch wird bei 37°C inkubiert und nach 2,5 ; 5,0 ; 7,5 ; 10 Minuten jeweils 0,2 ml entnommen und zu 0,1 ml Fibrinogen in ein Glasröhrchen (Durchmesser 0,5 cm) gegeben. Im gleichen Augenblick wird die Stoppuhr in Gang gebracht, die uns beim Auftreten des ersten sichtbaren Fibrinfadens die Gerinnungszeit angibt. Das Gemisch wird dabei durch einen abgebogenen Messingdraht dauernd in Bewegung gehalten.

Die Gerinnungszeit (GZ) der für die Versuche zu verwendenden Prothrombinlösung soll möglichst 10 - 15 sec. betragen.

Die Leerwerte für diese Bestimmung (physiol. NaCl an Stelle von PTB) sollten über 200 sec. liegen.

b) Bestimmung der Aktivität des Prothrombins

Als Maß für die Aktivität des Prothrombins soll der

Wert $E = \frac{100}{\text{GZ}}$ angenommen werden.

c) Reinigungsversuch

Zu je 5 ml einer Prothrombinlösung, von der die Aktivität (E) in den unter I. angegebenen Ansätzen A - D bestimmt wurde, werden 50 mg der unter II.b (1. - 9.) aufgeführten Adsorbentien hinzugefügt (bei der DEAE-Zellulose und beim Dowex - X 1 werden 1 ml der Lösung abzentrifugiert und

die Prothrombinlösung auf den feuchten Niederschlag gegeben) und 10 Minuten geschüttelt. Danach wird zentrifugiert, der Niederschlag in der Gefriertruhe aufbewahrt und im Überstand die Aktivität des Prothrombins bei $\text{pH} = 7,0$ wieder gemessen. Sind dabei weniger als 60 % der ursprünglichen Prothrombinaktivität enthalten, wird der Niederschlag mit 5 ml Aqua bidest. aufgelöst und wieder abzentrifugiert. Das Prothrombin wird im so gewonnenen 2. Niederschlag mit 1 ccm 5%iger Natriumcitratlösung eluiert und abzentrifugiert. Im Überstand, der auf 5 ml mit Aqua bidest. verdünnt wird, soll die Aktivität des Prothrombins gemessen werden.

E_A (E_{PTB}) ist dabei das Maß für die Aktivität des Prothrombins, die im Ansatz A (Siehe I.) gemessen wurde.

E_B (E_{VII}) entsprechend für Ansatz B, E_C (E_V) für Ansatz C,

E_D (E_{TK}) für Ansatz D.

Der Quotient $\frac{E_A}{E_B} = \frac{E_{\text{PTB}}}{E_{\text{VII}}}$ läßt erkennen, ob Faktor VII abgetrennt wurde, der Quotient $\frac{E_A}{E_C} = \frac{E_{\text{PTB}}}{E_V}$ ist Maß für die Abtrennung von Faktor V und der Quotient $\frac{E_A}{E_D} = \frac{E_{\text{PTB}}}{E_{\text{TK}}}$ läßt erkennen, ob Thrombokinase abgetrennt wurde. (Siehe Abbildungen !).

Je größer der Zahlenwert des Quotienten umso weniger verunreinigende Faktoren (VII, V bzw. TK) sind im Prothrombin zurückgeblieben.

VERSUCHSERGEBNISSE

Vorversuch

Die Aktivität des verwendeten Prothrombins 600701 nimmt bei steigender Konzentration gleichmäßig zu. Die für die Versuche angenommene günstigste Gerinnungszeit (PTB-Aktivität E = 7,0 - 10,0) liegt in diesem Fall bei einer Konzentration von 50 mg% und einer Inkubationszeit von 10 Minuten (Fig. 2). Der Leerwert lag über 200 sec. Bei Verwendung des Prothrombins 600701 werden in den folgenden Versuchen diese Werte beibehalten.

Reinigungsversuche

a) mit PTB 600701

1. durch Adsorption an DEAE-Zellulose

Im ersten Versuch ist ein geringer Reinigungserfolg nachzuweisen. Faktor VII (X) und Thrombokinase wurden in sehr geringen Mengen adsorbiert, während Faktor V voll wirksam blieb. (Fig. 3b) Die ursprüngliche Aktivität blieb dabei fast im Prothrombin erhalten. (Fig. 3a)

2. durch Adsorption an Aktivkohle (Eponit)

Bei Benutzung von Aktivkohle als Adsorbens konnte keine Reinigung des Prothrombins nachgewiesen werden. (Fig. 4b) Die Gerinnungszeiten waren im Kontrollversuch bei allen Ansätzen gering verlängert. (Fig. 4a)

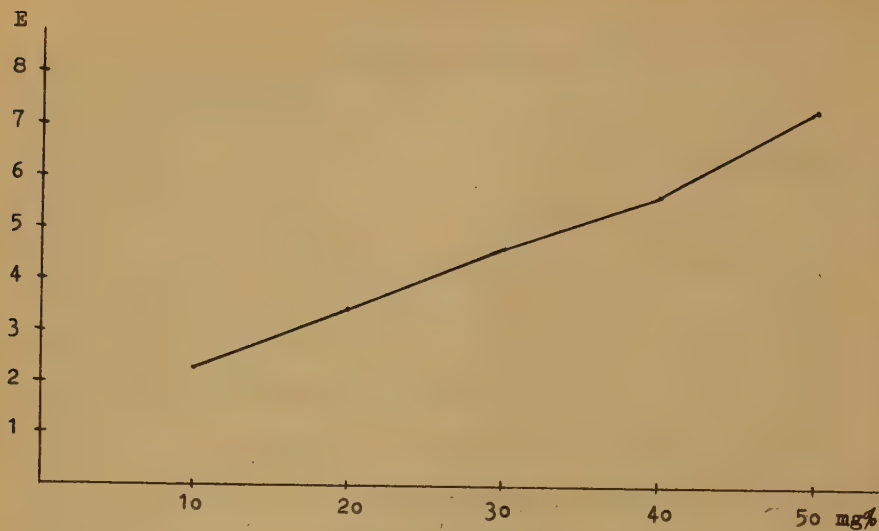


Fig. 2

PTB - Bestimmung

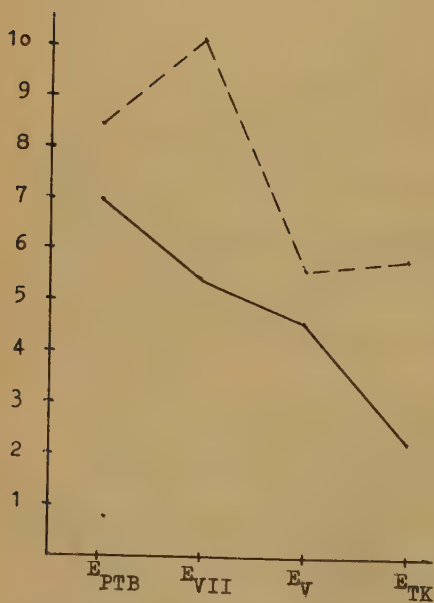


Fig. 3a

DEAE - Zellulose

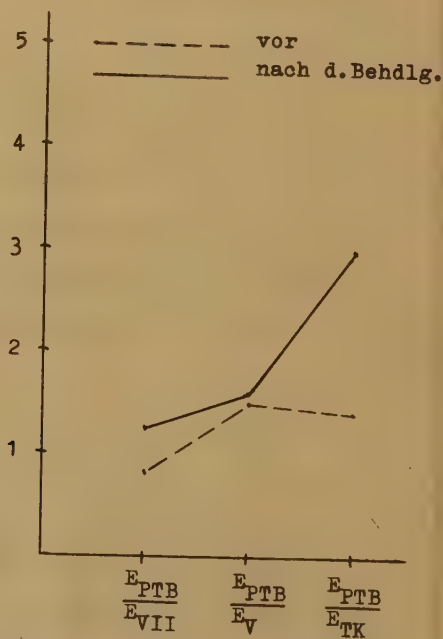


Fig. 3b

3. durch Adsorption an BaSO_4

Auch in diesem Versuch konnte kein nennenswerter Reinigungserfolg gezeigt werden. (Fig. 5b) Die Gerinnungszeiten waren nach dem Adsorptionsversuch kaum verändert. (Fig. 5a)

4. durch Adsorption an BaCO_3

Nur eine sehr geringe Reinigung konnte durch Adsorption an BaCO_3 erreicht werden. (Fig. 6b) Die Gerinnungszeiten differierten auch hier nur wenig. (Fig. 6a)

5. durch Adsorption an Dowex - X 1

Hierbei konnte eine Abtrennung von Faktor VII (X) und besonders von Thrombokinase nachgewiesen werden, während Faktor V nicht adsorbiert wurde. (Fig. 7b) Die Aktivität des Prothrombins ist nur wenig geringer geworden. (Fig. 7a)

6. durch Adsorption an Super Cel

Durch Verwendung von Super Cel ist eine geringe Abtrennung von Faktor VII(X) und Faktor V und eine größere Adsorption von Thrombokinase gelungen. (Fig. 8b) Die Aktivität des Prothrombins blieb dabei erhalten. (Fig. 8a)

7. durch Adsorption an Bentonit

Nach der Adsorption an Bentonit lag die Gerinnungszeit über 200 sec., es war also keine Prothrombinaktivität mehr vorhanden. Auch bei der Analyse des Niederschlages (Siehe IIIc) trat keine Gerinnung auf.

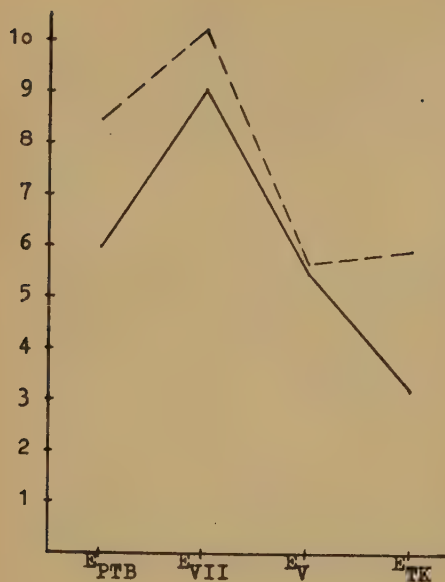


Fig. 4a

Aktivkohle (Eponit)

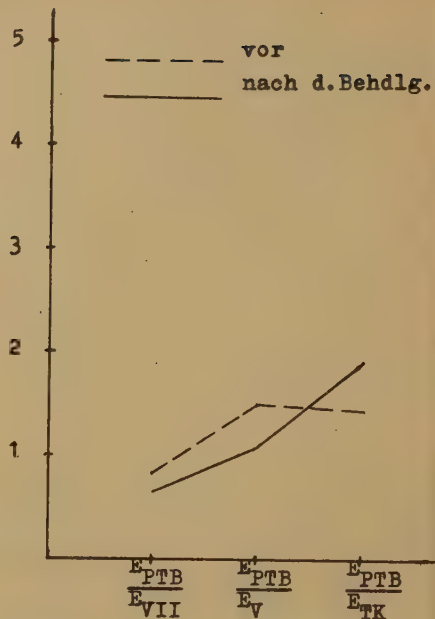


Fig. 4b

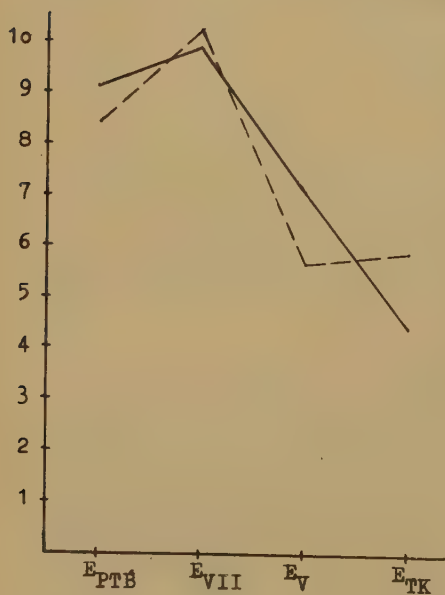


Fig. 5a

BaSO₄

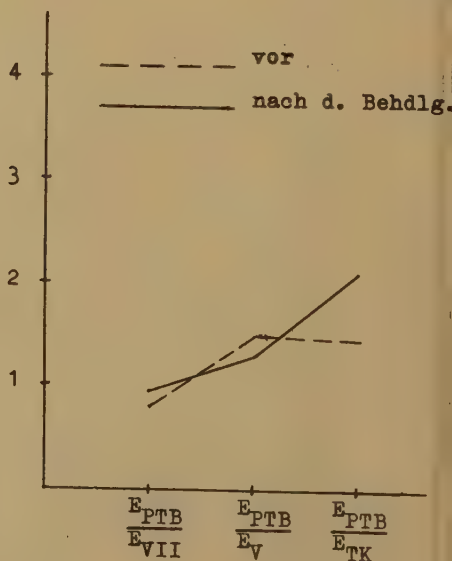


Fig. 5b

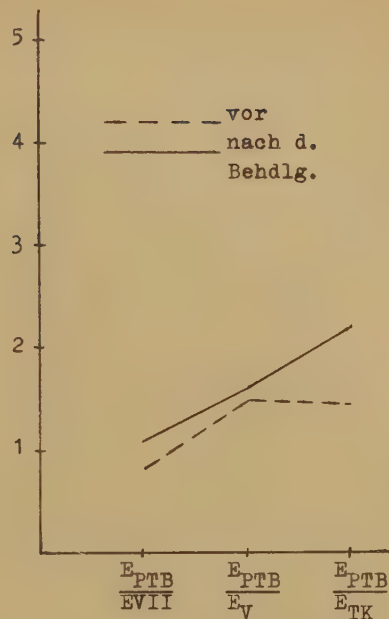
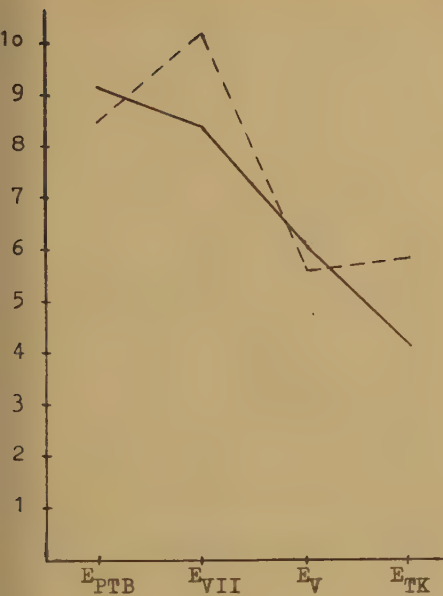


Fig. 6a

$BaCO_3$

Fig. 6b

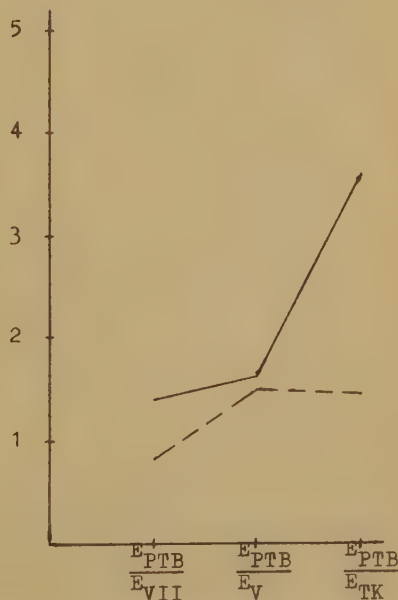
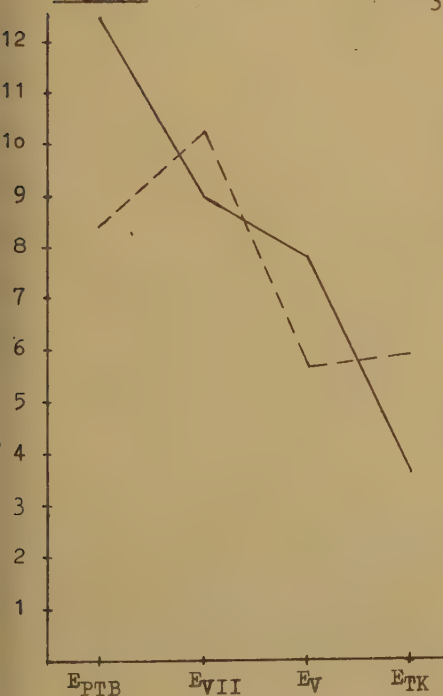


Fig. 7a + b Dowex - X 1

8. durch Adsorption an Bolus alba (Kaolin)

Wie beim Bentonit kein Reinigungserfolg, alle Gerinnungszeiten lagen über 200 sec.

9. durch Adsorption an SiO_2

Wie beim Bentonit und Bolus alba kein Reinigungserfolg, sämtliche Gerinnungszeiten lagen über 200 sec.

b) Für die weiteren Reinigungsversuche wurde ein Prothrombin verwendet, das aus mehreren, in verschiedenen Ansätzen hergestellten Prothrombinen gemischt wurde. Ein Vorversuch vor der Reinigung (Fig. 9a u.b) ergab, daß dieses Mischprothrombin noch reichlich Faktor V und Faktor VII enthielt, aber keine Thrombokinase mehr. Aktivkohle, BaSO_4 und BaCO_3 wurden dabei als Adsorbentien nicht mehr verwendet.

1. durch Adsorption an DEAE-Zellulose, Dowex - X 1 und Super Cel

In Versuchen mit der doppelten Menge dieser Adsorbentien wurde auch das Prothrombin adsorbiert (Gerinnungszeit über 200 sec.). Die Analyse der Niederschläge (Siehe IIIc) dieser Versuche ergab ebenfalls keine Prothrombinaktivität mehr (Gerinnungszeit über 200 sec.).

Ein Zwischenversuch sollte klären, ob die Natriumcitratlösung einen Einfluss auf die Prothrombinaktivität hat. 4 ml Prothrombinlösung wurden mit 1 ml 1%igem Natriumcitrat, dann mit 1 ml physiol. NaCl-

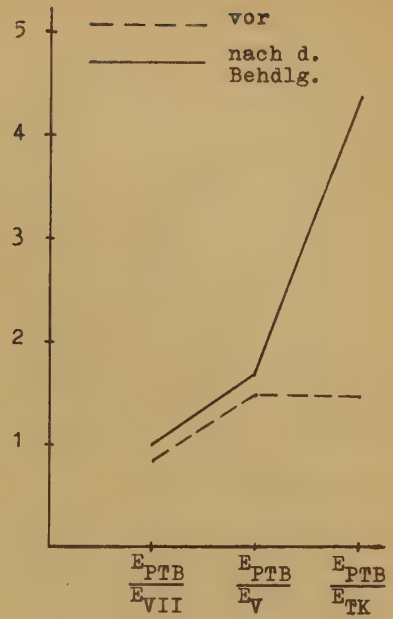
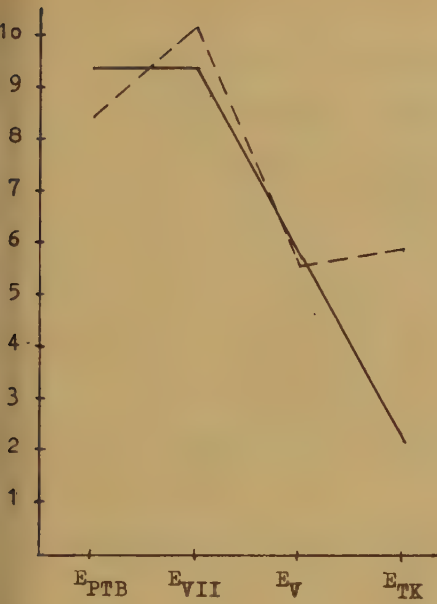


Fig. 8a

Super Cel

Fig. 8b

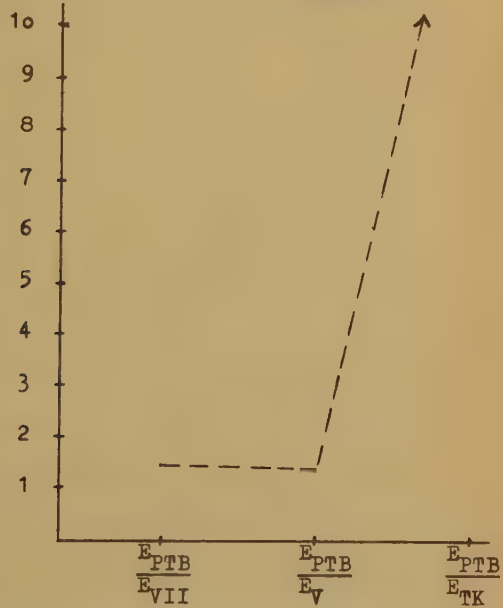
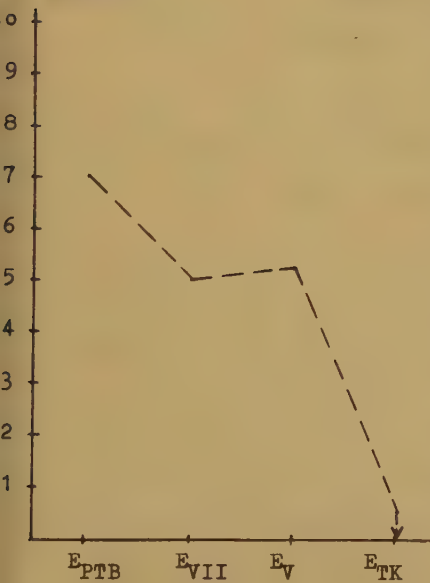


Fig. 9a Mischprothrombin-Bestimmung (keine TK mehr) Fig. 9b

Lösung gemessen. Die Werte ergaben keinen wesentlichen Unterschied, die Werte mit der 1%igen Natriumcitrat-Lösung hatten sogar noch eine kürzere Gerinnungszeit. In einem weiteren Versuch zur Analyse des Niederschlages wurde zur Erhöhung der Ionenkonzentration eine Lösung aus 1%igem Natriumcitrat und 5%igem NaCl verwendet. Bei Adsorption an DEAE-Zellulose, Dowex - X 1, Super Cel, Bentonit und SiO_2 lagen die Gerinnungszeiten über 200 sec., so daß eine Prothrombinaktivität nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Versuche mit geringerer Menge DEAE-Zellulose, Dowex - X 1 und Super Cel ergaben keinen Reinigungserfolg mehr.

2. durch Adsorption an Bentonit, SiO_2 und Bolus alba

Die Menge dieser Adsorptionsmittel wurde zunächst auf $1/5$, also 10 mg reduziert. Hierbei ergab sich ein Reinigungserfolg und zwar eine Abtrennung von Faktor VII, während der Faktor V die gleiche Aktivität behielt. (Fig. 10b) Das Prothrombin selbst verlor an Aktivität. (Fig. 10a)

In weiteren Versuchen wurde die Menge der Adsorptionsmittel Bentonit und SiO_2 auf $1/25$, also 2 mg reduziert, die Menge Bolus alba wieder auf 20 mg erhöht. Dabei wurde beim Bolus alba auch das Prothrombin adsorbiert. (Gerinnungszeit über 200 sec.) Dagegen konnte beim Bentonit und SiO_2 ein guter Reinigungserfolg erzielt werden. (Fig. 11b) Die Aktivität des Prothrombins hat beim SiO_2 wenig, beim Bentonit stärker abgenommen, (Fig. 11a) das Präparat ist aber Faktor V- und

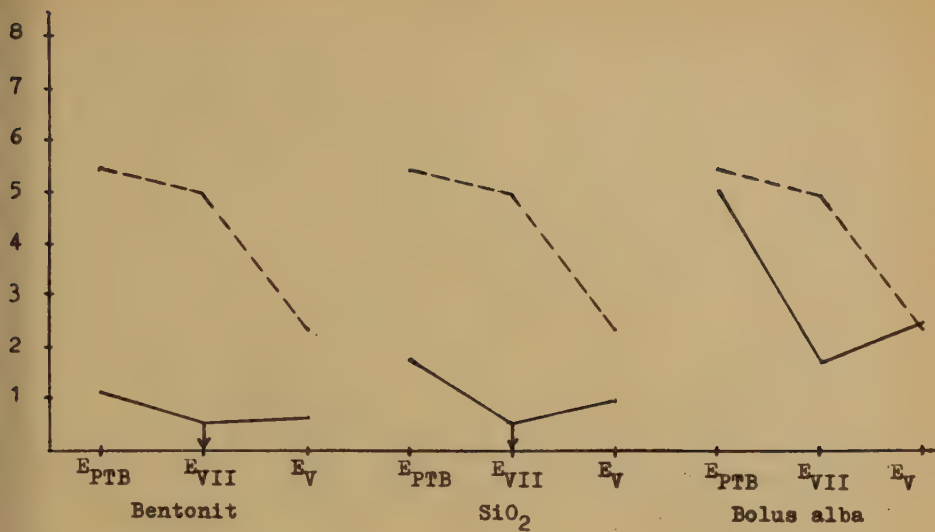


Fig. 10a

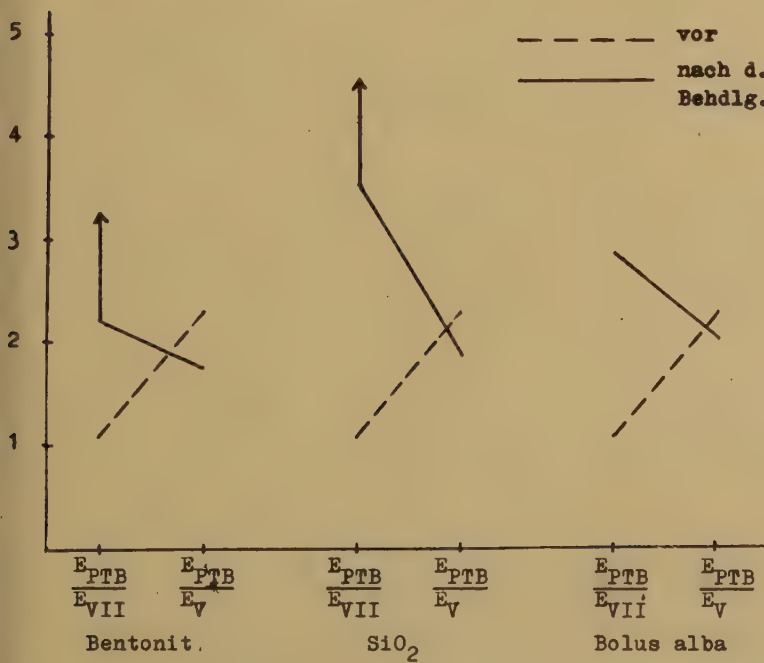


Fig. 10b

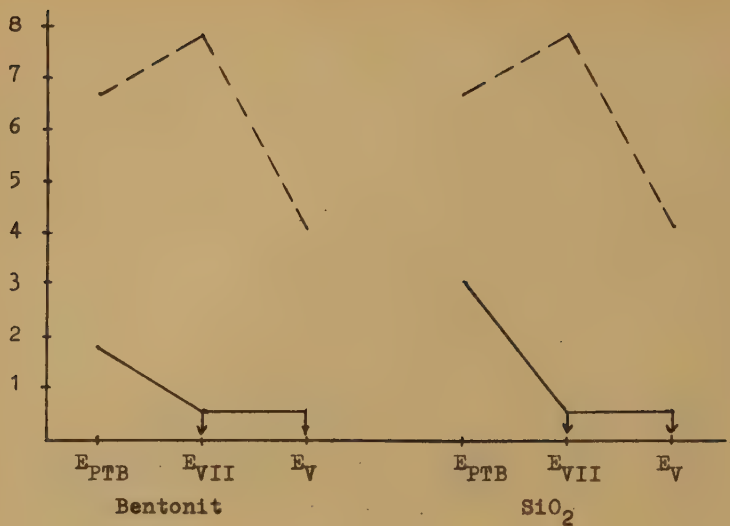


Fig. 11a

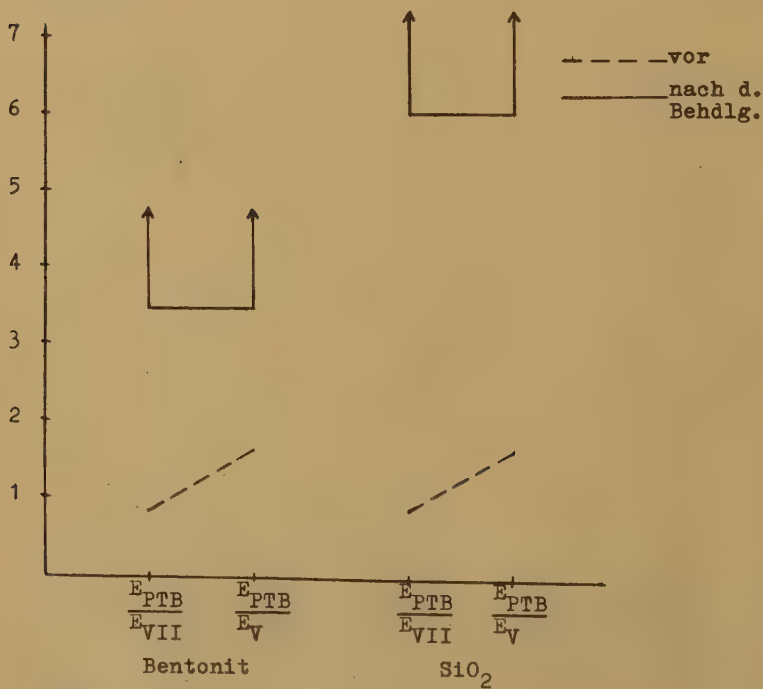


Fig. 11b

Faktor VII-frei. (Gerinnungszeit über 200 sec.)

Versuche mit noch geringerer Menge Adsorptionsmittel zeigten keine Abtrennung der Faktoren mehr.

- c) Versuche mit säurebehandeltem Prothrombin (zur Zerstörung von Faktor V) und Adsorption an Bentonit, SiO_2 und Bolus alba.

Gleiche Mengen einer Prothrombinlösung und n/10 HCl wurden zusammengegeben und 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann mit n/10 NaOH neutralisiert. Hierbei erhielt ich ein Faktor VII-freies Präparat (Gerinnungszeit über 200 sec.), während Faktor V nach der Säurebehandlung und Reinigung noch annähernd diegleiche Aktivität hatte. (Fig. 12b) Das Prothrombin verlor bei der Reinigung an Aktivität. (Fig. 12a)

- d) Weitere Reinigungsversuche durch Adsorption an SiO_2
Bisher hatte ich mit dem SiO_2 die besten Reinigungserfolge, so daß bei den weiteren Versuchen nur noch dieses Adsorptionsmittel verwendet wurde.

1. Bei Änderung der Prothrombinmenge, der Menge des Adsorbens und Änderung der Adsorptionszeit (von 10 Minuten auf 30 Minuten).

50 ml einer 10 mg%igen Prothrombinlösung wurden zunächst mit 15 mg 10 Minuten geschüttelt, abzentrifugiert und die Aktivität gemessen. Faktor V und Faktor VII wurden nicht adsorbiert. Danach wurde

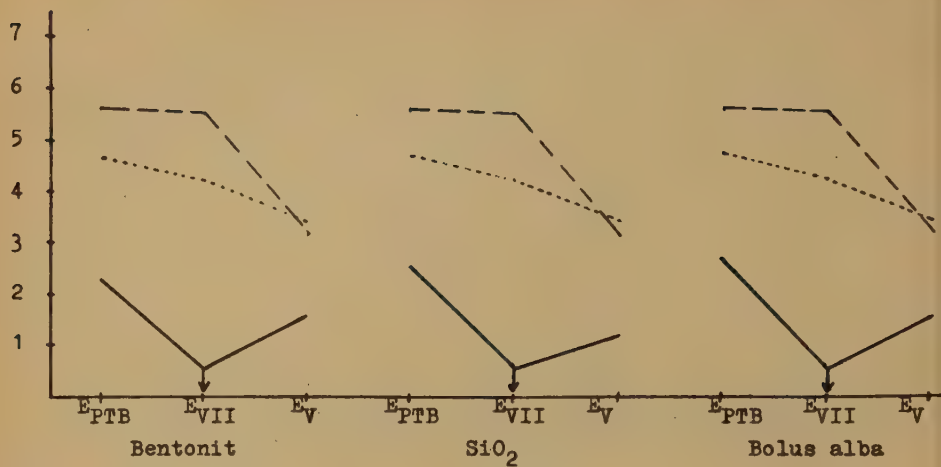


Fig. 12a

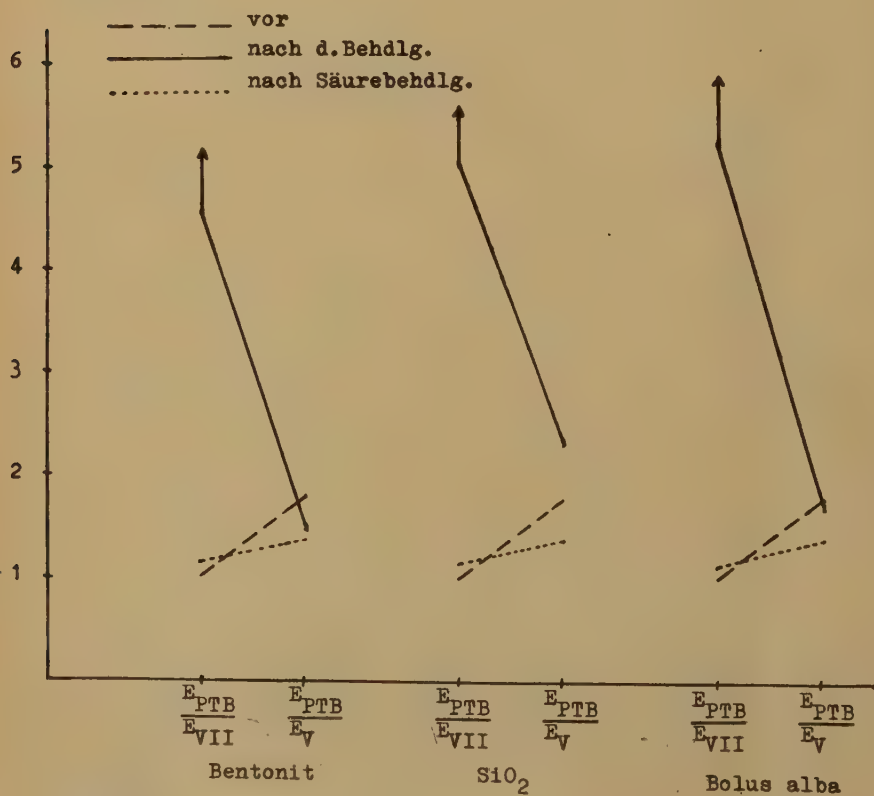


Fig. 12b

die gleiche Lösung weiter an je 5 mg SiO_2 adsorbiert. Bei insgesamt 45 mg waren immer noch die Faktoren vorhanden. Deshalb wurden noch einmal 20 mg genommen, jetzt aber 30 Minuten geschüttelt. Danach war kein Faktor VII mehr im Prothrombin nachzuweisen (Gerinnungszeit über 200 sec.), während Faktor V die gleiche Aktivität behielt. (Fig. 13b) Das Prothrombin hat an Aktivität verloren. (Fig. 13a)

Im nächsten Versuch wurden 50 ml einer 10 mg%igen Prothrombinlösung mit 50 mg SiO_2 30 Minuten geschüttelt. Faktor VII und Faktor V wurden adsorbiert (Fig. 14b) (Gerinnungszeit über 200 sec.), aber auch das Prothrombin selbst wurde teilweise adsorbiert und hat an Aktivität verloren. (Fig. 14a)

2. bei säurebehandeltem Prothrombin

Die Frage, ob man bei einem säurebehandelten Prothrombin mit weniger Adsorptionsmittel auskommt, wurde durch folgenden Versuch beantwortet. Die gleiche Menge Prothrombin wie im letzten Versuch (50 ml 10 mg%ig) wurde jetzt an 20 mg SiO_2 adsorbiert. Faktor VII und Faktor V ~~fehlen~~ (Fig. 15b) (Gerinnungszeit über 200 sec.), ohne daß dabei das Prothrombin selbst stark an Aktivität verloren hat. (Fig. 15a)

3. bei Änderung des pH-Wertes und Verwendung eines anderen Prothrombins (610906)

5 ml dieser 10 %igen Prothrombinlösung wurden einmal bei pH = 5,0 und zum anderen bei pH = 9,0 an 2 mg SiO_2 adsorbiert und dann bei pH = 7,0 gemessen. Dabei

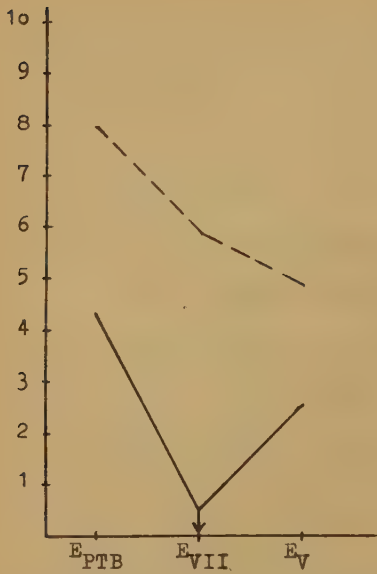


Fig. 13a SiO_2

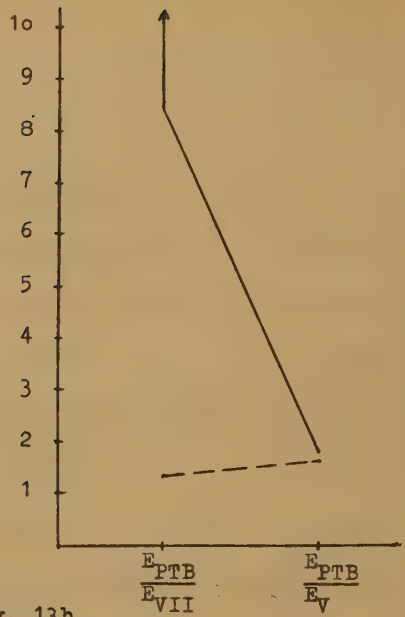


Fig. 13b

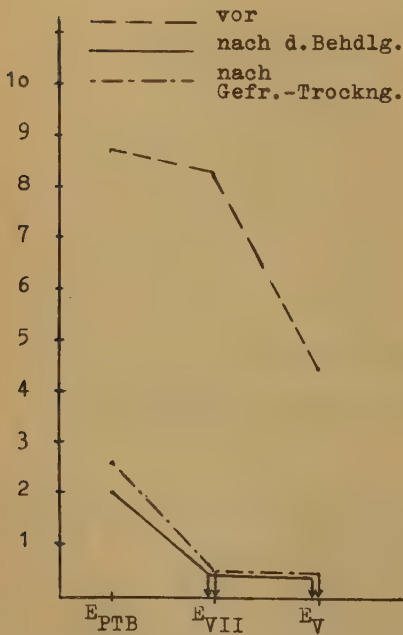
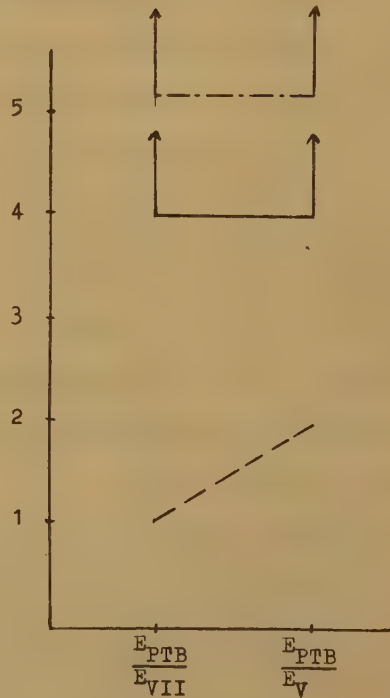


Fig. 14a



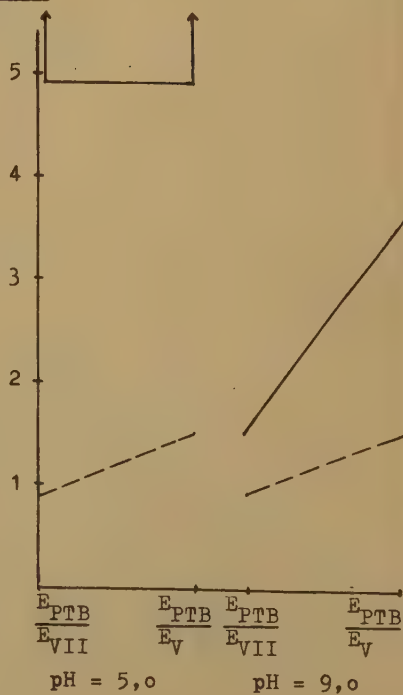
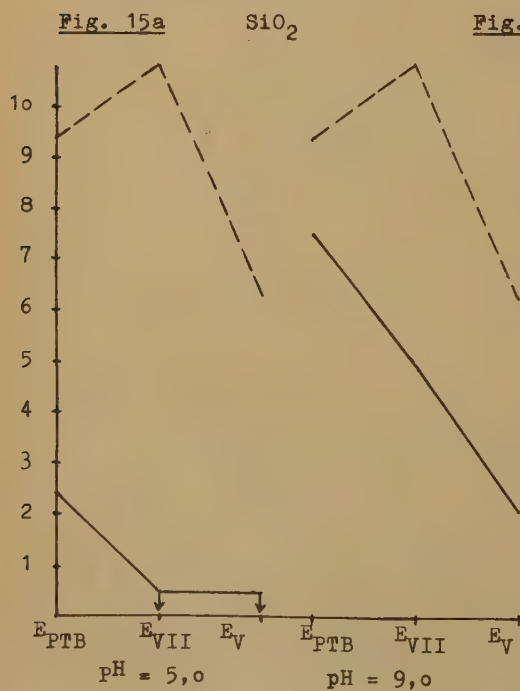
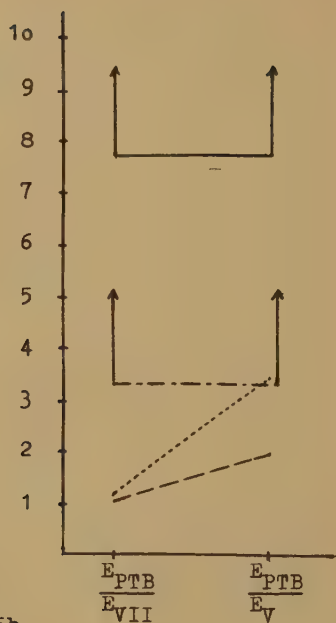
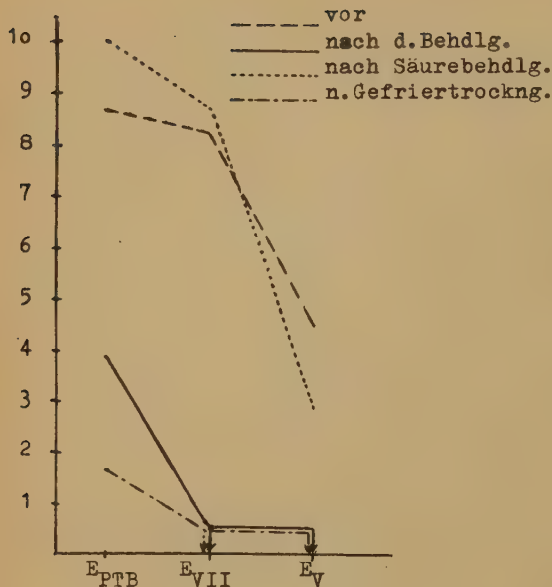
SiO_2

Fig. 14b

stellte sich ein erheblicher Unterschied heraus: bei pH = 5,0 ein guter Reinigungserfolg, während bei pH = 9,0 der Faktor VII nicht und der Faktor V kaum adsorbiert wurde. (Fig. 16b) Die Prothrombinaktivität ist aber bei pH = 5,0 stark zurückgegangen. (Fig. 16a) Von einem anderen Prothrombin wurde zunächst eine Lösung hergestellt, die die gleiche Aktivität hat wie die bisher verwendeten Mischprothrombine. Diese 2,5 mg%ige Lösung wurde auf pH = 3,0 gebracht und 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen (Säurebehandlung) und dann die Aktivität gemessen. Danach wurden 5 ml dieser Lösung bei pH = 3,0 und bei pH = 5,0 an 2 mg SiO_2 adsorbiert und bei pH = 7,0 gemessen. Es ergab einen guten Reinigungserfolg, wobei zwischen der Adsorption bei pH = 3,0 und bei pH = 5,0 kein wesentlicher Unterschied auftrat. (Fig. 17b) Die Aktivität des Prothrombins ist allerdings geringer geworden. (Fig. 17a)

4. bei Erhöhung der Konzentration der Prothrombinlösung

100 ml einer 100 mg%igen Prothrombinlösung wurden an 400 mg SiO_2 adsorbiert. Kein Reinigungserfolg. Auch als diese Lösung an weitere 400 mg adsorbiert wurde, konnte keine Reinigung festgestellt werden. Es wurden dann 5 ml 50 mg%iges Prothrombin auf pH = 3,0 gebracht (Säurebehandlung) und 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurden 5 ml dieser Lösung bei



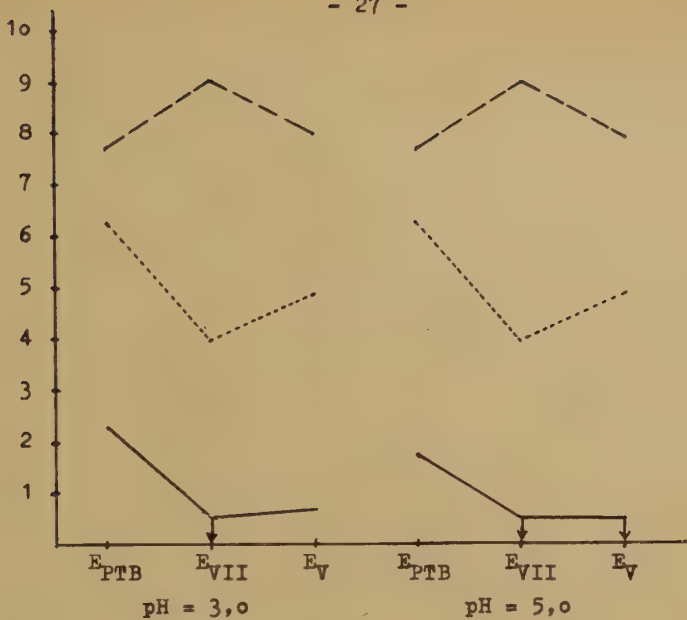


Fig. 17a

SiO_2

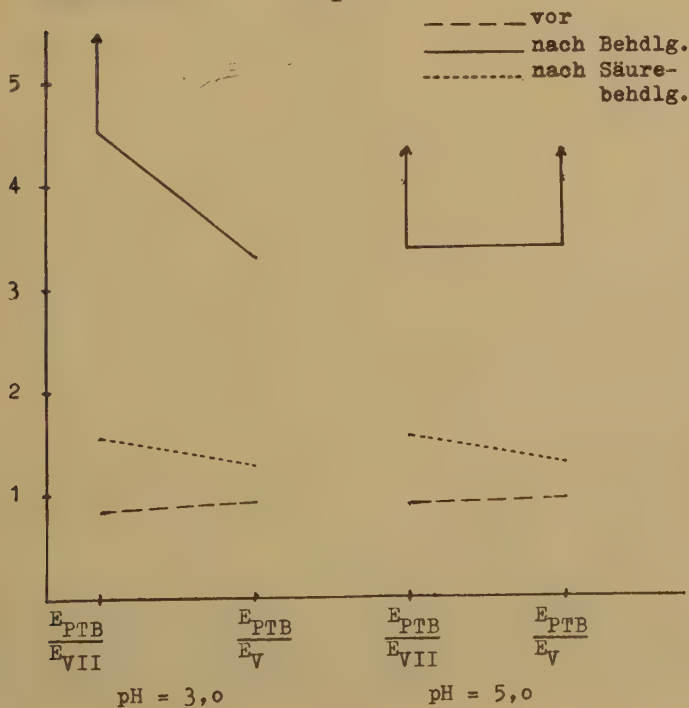


Fig. 17b

SiO_2

pH = 3,0 , bei pH = 5,0 , bei pH = 7,0 an 10 mg SiO_2 adsorbiert und dann 10 mg%ig bei pH = 7,0 gemessen.

Der beste Reinigungserfolg wurde bei pH = 5,0 erzielt, da hierbei Faktor VII und Faktor V ganz adsorbiert wurden, während bei pH = 3,0 noch Faktor V und bei pH = 7,0 noch geringe Mengen Faktor V und VII vorhanden waren.

(Fig.18b) Die Aktivität des Prothrombins ist stark zurückgegangen. (Fig.18a)

Ein weiterer Versuch mit 50 ml einer 50 mg%igen Prothrombinlösung, die auf pH = 3,0 eingestellt 20 Minuten stehen gelassen wurde, dann bei pH = 5,0 an 50 mg SiO_2 adsorbiert wurde und danach mit 10 mg% bei pH = 7,0 gemessen wurde, ergab ebenfalls einen guten Reinigungserfolg.

Faktor V und VII konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

(Fig.19b) Dabei wurde aber auch das Prothrombin zum Teil adsorbiert. (Fig.19a) Der gleiche Versuch von 100 ml einer 200 mg%igen Prothrombinlösung durch Adsorption an 400 mg SiO_2 hatte den besten Reinigungserfolg. Faktor VII und V wurden adsorbiert (Fig.20b), wobei das Prothrombin nur sehr gering an Aktivität verloren hat. (Fig.20a)

e) Gefriertrocknung der gereinigten Prothrombine und Kontrolle.

Die meisten Lösungen der gereinigten Prothrombine wurden gefriergetrocknet und dann noch einmal in höherer Konzentration gemessen. Faktor VII und V konnten nicht mehr im Prothrombin festgestellt werden. (Fig.14b, Fig. 15b, Fig.19b) Durch die Gefriertrocknung hat dabei je-

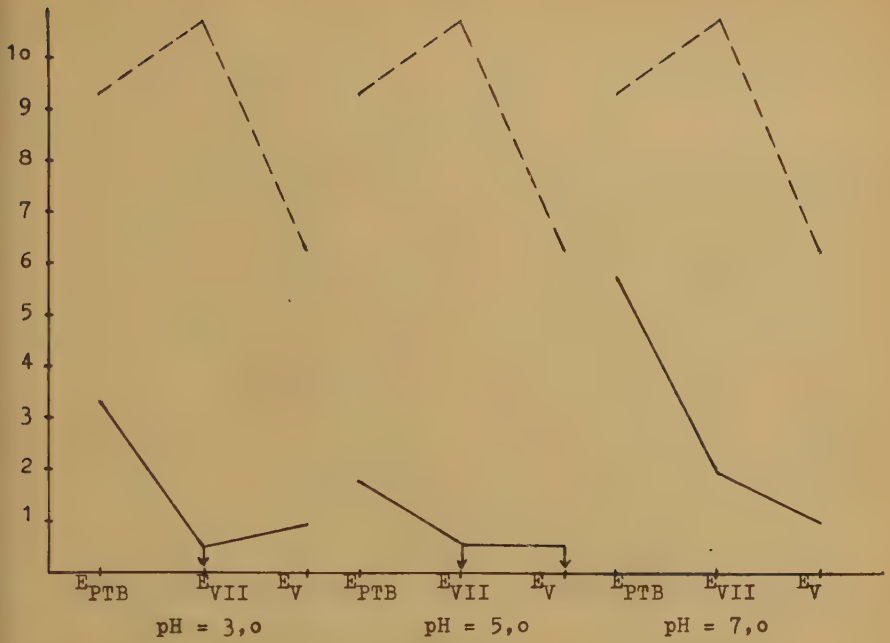


Fig. 18a

SiO_2

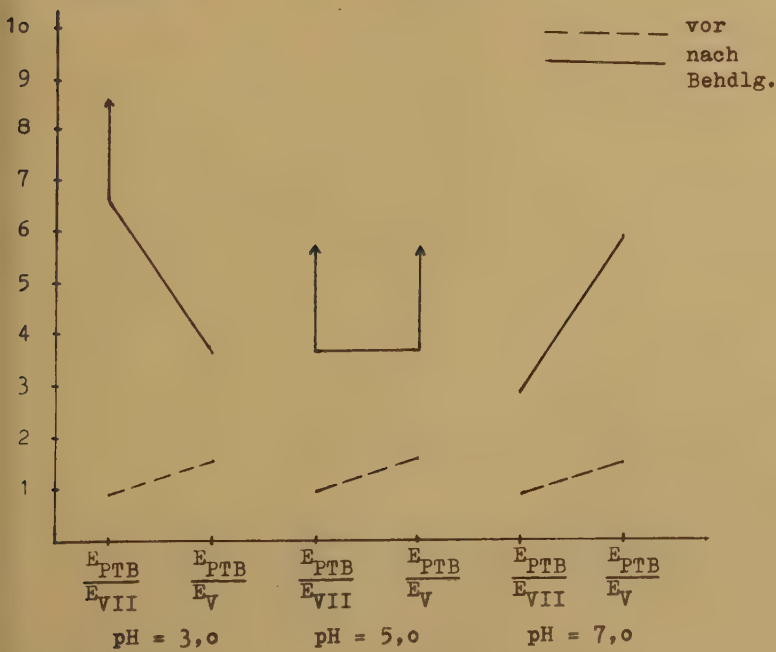


Fig. 18b

SiO_2

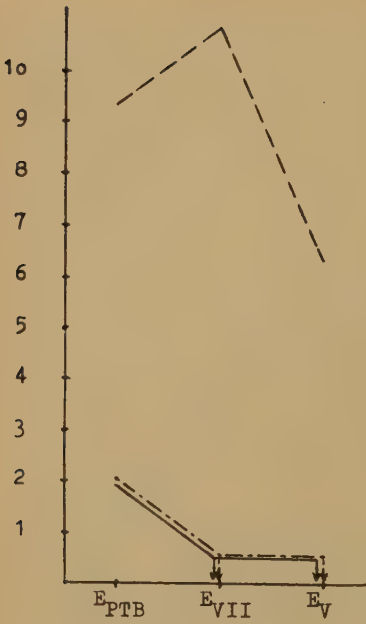


Fig. 19a

SiO_2

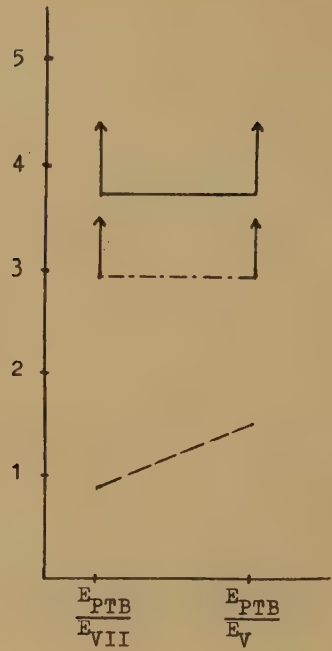


Fig. 19b

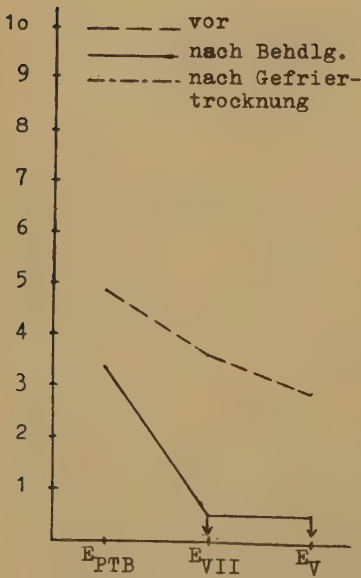


Fig. 20a

SiO_2

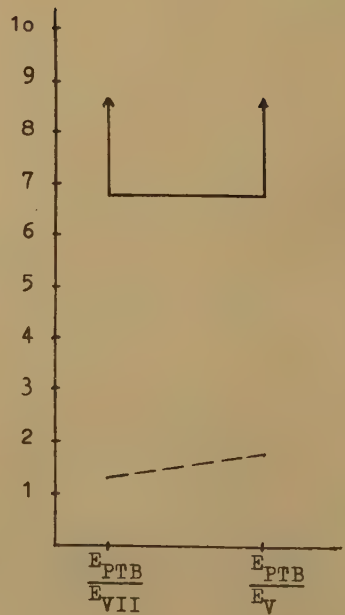


Fig. 20b

weils das Prothrombin noch einmal an Aktivität verloren. (Fig. 14a, Fig. 15a, Fig. 19a)

Lediglich im letzten Versuch (Fig. 20) war nach der Gefriertrocknung wieder Faktor VII und V nachzuweisen. Ich nehme an, daß sich in dieser 200 mg%igen Lösung doch nicht alles Prothrombin gelöst hat, und dadurch die Faktoren auch nicht abgetrennt wurden, so daß sie nach der Gefriertrocknung wieder voll wirksam waren. Ob durch Filtration der Ausgangslösung das nichtgelöste Prothrombin abgetrennt werden kann, um so auch bei dieser hohen Konzentration zum Erfolg zu kommen, konnte nicht mehr nachgewiesen werden.

Zum Schluß seien noch einmal die wichtigsten Versuchsergebnisse, die ich durch Adsorption an SiO_2 erhielt, in einer Tabelle zusammengefaßt. Bei diesem Vergleich ist zu berücksichtigen, daß die Prothrombinaktivität vor und nach der Reinigung in gleicher Konzentration gemessen wurde, während für die Messung nach Gefriertrocknung eine höhere Konzentration (durchschnittlich um das 5-fache) genommen wurde. Alle Präparate sind Faktor VII- und Faktor V-frei.

Prothrombinaktivität (100/GZ)			
vor Reinig.	nach Reinig.	nach Gefr.-Trock.	
8,70	2,0	2,58	(Fig. 14a)
8,70	3,85	1,64	(Fig. 15a)
9,35	1,86	1,94	(Fig. 19a)
4,78	3,39	./.	(Fig. 20a)

DISKUSSION

Wie die Versuche zeigen, gibt uns die Adsorptionsmethode die Möglichkeit, das Prothrombin zu reinigen und ein Faktor V- und Faktor VII-freies Präparat herzustellen. Im Gegensatz zu Versuchen anderer Autoren wurde in diesem Fall das von R o k a (6.) hergestellte Prothrombin, das bereits zur Reinigung an BaSO_4 adsorbiert wurde, verwendet. Es ist also ein Präparat, das schon ausreichend gereinigt war, um damit ein System zusammenzustellen, mit dem sich die Aktivität der einzelnen Gerinnungsfaktoren bestimmen läßt.

Ältere Versuche, durch Konstanthalten des Adsorptionsmittels die Adsorptions- und Elutionsbedingungen so zu variieren, daß eine Abtrennung von Prothrombin, Faktor VII und Faktor V erreicht wurde, verliefen erfolglos (8.) So wurde jetzt eine Reihe von Adsorbentien gewählt, um daraus zunächst optimale Bedingungen zur Reindarstellung des Prothrombins zu finden.

Mit BaSO_4 , das auch S t r ä s s l e und S u r g e n o r (5.) schon verwendeten, konnte kein weiterer Reinigungserfolg erzielt werden. Das liegt wahrscheinlich darin begründet, daß das für die Versuche verwendete Prothrombin bei der Herstellung bereits an BaSO_4 adsorbiert wurde, und damit schon ein maximaler Reinigungsschritt für dieses Mittel erreicht worden ist.

So waren auch das BaCO_3 und die Aktivkohle (Eponit) für

eine stärkere Abtrennung der Faktoren nicht geeignet. Dagegen konnte mit DEAE-Zellulose, Dowex - X 1 und Super Cel eine Abtrennung besonders des Faktors VII und der Thrombokinasе erreicht werden, die aber so gering war, daß wir kein wesentlich verbessertes Prothrombin erhielten. Mit Bentonit, Bolus alba und SiO_2 wurde ein guter Reinigungserfolg erzielt. Wir erhielten ein Faktor V- und Faktor VII-freies Präparat bei der Adsorption an SiO_2 , wobei die Prothrombinaktivität zu einem großen Teil erhalten blieb. Auch nach der Gefriertrocknung der verwendeten Prothrombinlösung konnte weder Faktor V noch Faktor VII nachgewiesen werden.

Bei der Adsorption ist darauf zu achten, daß kein Überschuß an SiO_2 verwendet wird, da sonst zuviel Prothrombin mitadsorbiert wird, das sich nicht mehr eluieren läßt, wie weiter unten noch eingehender besprochen wird. Es ist daher erforderlich für das jeweils zu reinigende Prothrombinpräparat an kleinen Proben die erforderliche Menge an SiO_2 zu ermitteln, mit der die Abtrennung von Faktor VII und V gelingt ohne zu große Verluste an Prothrombinaktivität.

Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf den Gerinnungsablauf ist bekannt. Es soll bei einem pH unter 5,7 und über 10,2 keine Gerinnung mehr erfolgen. (9.) So wird es wahrscheinlich zu erklären sein, daß die Wasserstoffionenkonzentration auch bei der Adsorptionsmethode zur Reindarstellung des Prothrombins einen ent-

scheidenden Einfluss hat. Bei einem pH von 9,0 war keine Reinigung möglich, während die pH-Werte 3,0; 5,0; 7,0 gute Adsorptionsbedingungen zeigten, wobei ein Optimum bei pH = 5,0 zu liegen scheint.

Die Beobachtungen O w r e n s (10.), daß Faktor V (Proaccelerin) bei pH-Werten unter 4,0 zerstört wird, um es auf diese Weise vom Prothrombin abtrennen zu können, konnten nicht bestätigt werden. So war in unserer Lösung, die 30 Minuten bei pH = 3,0 inkubiert wurde, immer noch Faktor V nachzuweisen.

Die Beobachtungen Q u i c k s und S t e f a n i n i s (11.), daß das adsorbierte Prothrombin aus den Adsorbentien mit 5 %iger Natriumcitratlösung eluiert wird, war in unseren Versuchen nicht festzustellen. So war durch Adsorption an bestimmte Mengen Bentonit, SiO_2 und Bolus alba in einem Versuch fast alles Prothrombin mitadsorbiert, und es war nicht möglich, es durch 5 %ige Natriumcitratlösung zu eluieren. Auch durch Zusatz von 5 % NaCl zur Erhöhung der Ionenkonzentration gelang die Eluation nicht.

ZUSAMMENFASSUNG

Die besondere Bedeutung der Adsorptionsmethode zur Reindarstellung des Prothrombins konnte bestätigt werden. Eine Reihe von Adsorbentien wurde gewählt, von denen DEAE-Zellulose, Dowex - X 1 und Super Cel geringe, Bentonit und Bolus alba gute Reinigungserfolge hatten. Mit Hilfe des SiO_2 konnte ein Faktor V- und Faktor VII-freies Prothrombinpräparat hergestellt werden, allerdings unter Verlust an Prothrombinaktivität. Das gereinigte Prothrombin läßt sich gefriertrocknen. Das Adsorptionsoptimum an SiO_2 lag bei einem pH-Wert um 5,0 , die Adsorptionszeit betrug 30 Minuten.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1.) E.Deutsch: Blutgerinnungsfaktoren
Verlag E. Deuticke, Wien 1955
- (2.) L. Roka: Kinetik der Prothrombinumwandlung
"Fourth International Congress of
Biochemistry Vol.X-Blood Clotting
Factors"
Great Britain, J.W. Arrowsmith Ltd.
- (3.) H.G. Lasch und L. Roka: Zur Prothrombinbildung
in der Leber.
Z. physiol. Chemie 294,30 (1953)
- (4.) H.G. Lasch und L. Roka: Über den Bildungs-
mechanismus Prothrombin und Faktor VII
Kli.Wo. 32,460 (1954)
- (5.) Owren, Seegers, Flynn, Coon, Strässle, Surgenor:
zit. n. E. Deutsch, Blutgerinnungsfaktoren
Verlag E. Deuticke, Wien 1955
- (6.) L. Roka: Der Umbau von Prothrombin in Thrombin
durch Trypsin, I.
Z. physiol. Chemie 323,145 (1961)
- (7.) M.L. Lewis and A.G. Ware: zit.n. E. Deutsch
Blutgerinnungsfaktoren
Verlag E. Deuticke, Wien 1955
- (8.) L. Roka: Habilitationsschrift und unveröffentlichte
Versuche
- (9.) Tinoco I. und Ferry J.D., Edsall J.T. und Lever W.F.:
zit. n. E. Deutsch
Blutgerinnungsfaktoren
Verlag E. Deuticke, Wien 1955

- (10.) Owren P.A.: zit.n. E.Deutsch
Blutgerinnungsfaktoren
Verlag E. Deuticke, Wien 1955
- (11.) Quick A.J. und Stefanini M.:zit.n.E.Deutsch
Blutgerinnungsfaktoren
Verlag E. Deuticke, Wien

Herrn Professor Dr. L. R o k a möchte ich
für die Überlassung des Themas, für die wert-
vollen Ratschläge und die Unterstützung bei
der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Als Sohn des Zahnarztes Arthur Lange und seiner Ehefrau Karola, geb. Westing wurde ich am 12. September 1935 in Oldenburg i.O. geboren.

In Zetel i.O. wurde ich 1941 in die Volksschule aufgenommen. 1946 bestand ich die Aufnahmeprüfung an der Oberschule für Jungen in Varel i.O., die ich bis zum Abitur im Jahre 1955 besuchte.

Im Sommersemester 1955 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Universität Marburg an der Lahn.

Das Physicum legte ich im April 1958 dort ab.

Nach einem Wechsel in die juristische Fakultät der Universität Frankfurt am Main setzte ich dort im Wintersemester 1958/59 mein klinisches Studium der Zahnmedizin fort und beendete es am 30. Juni 1961 mit dem Staatsexamen.

Frankfurt am Main, im Mai 1962

